

RESISTANCE A L'ETHIONINE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE¹

HUGUETTE DE ROBICHON-SZULMAJSTER ET HELENE CHEREST

Laboratoire d'Enzymologie du CNRS, Gif-sur-Yvette, Essonne, France

Received April 9, 1966

NOUS avons mis en évidence l'existence de trois gènes indépendants impliqués dans la manifestation de la résistance envers l'éthionine chez *Saccharomyces cerevisiae* (CHEREST et DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1966). (1) *AAP/aap*, amino-acide perméase, règle la capacité d'accumulation des acides aminés et, également de leurs analogues structuraux (SURDIN *et al.* 1965). L'allèle *AAP* = 100 est présent chez le type sauvage. L'allèle muté = 10, confère une résistance vis-à-vis de différents analogues tels que la DL-éthionine ($2 \cdot 10^{-2}$ M), la DL-parafluorophénylalanine ($5 \cdot 10^{-3}$ M) et la L-canavanine ($1 \cdot 10^{-5}$ M). (2) *eth₁^r/eth₁^s*. L'allèle muté *eth₁^r* confère une résistance spécifique envers la DL-éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M. (3) *eth₂^s/eth₂^r*. L'allèle *eth₂^s*, présent chez le type sauvage, agit en abaissant considérablement le niveau de résistance envers l'éthionine qu'il soit conféré par l'allèle *aap* ou par l'allèle *eth₁^r*. Par contre, l'allèle *eth₂^s* est inactif sur la résistance vis-à-vis de la parafluorophénylalanine conférée par l'allèle *aap*. La présence de l'allèle muté *eth₂^r* est par conséquent nécessaire à la manifestation complète des phénotypes conférés par les allèles *eth₁^r* et *aap*.

L'inhibition de la croissance par l'éthionine et sa réversion par la méthionine, ont déjà été mises en évidence chez les mammifères, ainsi que chez les micro-organismes et en particulier chez la levure (LOVELESS *et al.* 1954). MAW (1961) a étudié l'effet de différents acides aminés et de substances structurellement et métaboliquement proches de la cystéine et de la méthionine chez *S. cerevisiae*. Alors que la méthionine reverse entièrement l'inhibition due à l'éthionine à des concentrations équimoléculaires, la méthionine sulfoxide, la S-méthyl-L-cystéine et l'acide α -amino-butérique sont capables de provoquer une réversion partielle mais pour des concentrations cinq fois supérieures à celles de la méthionine.

D'autre part, chez les mammifères, VILLA-TREVINO *et al.* (1963) ont montré que l'inhibition de la synthèse des protéines causée par l'éthionine, peut être réversée par l'ATP ou l'adénine. Par contre, les expériences de MAW (1961) n'avaient pas permis de mettre en évidence un effet de l'adénine dans des conditions analogues chez *S. cerevisiae*.

Le présent article est destiné, d'une part, à préciser les notions de niveau de résistance et de dominance pour différentes combinaisons des trois caractères impliqués dans la manifestation de la résistance à l'éthionine, et, d'autre part, de

¹ Ce travail a bénéficié de l'aide du Fonds de Développement à la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-063) et du Commissariat à l'Energie Atomique.

vérifier la spécificité de la réversion par la méthionine pour chacun des génotypes considérés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Souches: Toutes les souches haploïdes, et une partie des souches diploïdes utilisées, ont déjà été décrites (CHEREST et DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1966). D'autres diploïdes ont été isolés spécialement pour le présent travail (les techniques d'isolement des souches ont été décrites précédemment).

Souches haploïdes.

Type sauvage: *AAP*; *eth*₁^s; *eth*₂^s = 4094-B.

Mutants différant du type sauvage par un seul des caractères impliqués dans la manifestation de la résistance envers l'éthionine:

AAP; *eth*₁^s; *eth*₂^r = CH 82-10D; CC 30-1D

AAP; *eth*₁^r; *eth*₂^s = CH 82-7A

aap; *eth*₁^s; *eth*₂^s = CH 82-7B

Mutants différant du type sauvage par deux ou trois des caractères précédents:

AAP; *eth*₁^r; *eth*₂^r = CH 82-7D; CH 82-9C

aap; *eth*₁^s; *eth*₂^r = CH 82-7C, CC 38-2B, CC 38-4B, CC 38-4C

aap; *eth*₁^r; *eth*₂^r = 4094-B4

Souches diploïdes. Des croisements appropriés ont été effectués entre certaines des souches haploïdes ci-dessus. Les génotypes des souches diploïdes obtenues seront indiqués au cours de ce travail.

Milieux: Au milieu synthétique G 21 précédemment décrit seront ajoutées, selon les expériences, des quantités variables de DL-éthionine (Calbiochem), DL-parafluorophénylalanine (Calbiochem) ainsi que différents acides aminés dont les concentrations seront précisées dans la partie expérimentale. Tous ces composés sont stérilisés indépendamment et ajoutés extemporanément au milieu G 21, à partir de solutions suffisamment concentrées pour éviter un facteur de dilution trop important.

Cultures: Les souches conservées sur tubes stocks (YPGA gélosé) sont inoculées à l'anse dans 10ml de milieu YPGA liquide. Après 24 heures de culture en tubes inclinés et agités à 28°C, les cellules sont centrifugées, lavées deux fois puis resuspendues dans 10 ml d'eau distillée stérile.

Toutes les cultures, en vue des courbes de croissance, sont effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer pourvues d'un diverticule formé d'un tube optique permettant la lecture directe des densités optiques. Ces fioles reçoivent 10 ml de milieu G 21 et un inoculum correspondant à environ 3×10^5 cellules par ml de culture. Les cultures sont placées sur un agitateur à 28°C. La variation de densité optique est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre Jouan à 650 m μ et sera exprimée en cellules/ml à l'aide d'un facteur de correction déterminé au préalable pour la souche-mère 4094-B.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. *Etude des inhibitions*

Nous avons indiqué précédemment les concentrations d'analogues d'acides aminés qui nous ont permis de caractériser la présence des allèles *aap* et *eth*₁^r au cours des expériences génétiques (CHEREST et DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1966). Il est apparu que la résistance conférée par ces deux allèles diffère à la fois qualitativement (résistance envers plusieurs analogues, due à l'allèle *aap* et résistance spécifique envers l'éthionine, due à l'allèle *eth*₁^r) et quantitativement (résistance vis-à-vis de l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}$ M pour l'allèle *aap* et résistance envers l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M pour l'allèle *eth*₁^r).

L'intervention de l'allèle *eth*₂^s sur la manifestation de la résistance à l'éthionine conférée par l'un ou l'autre des deux allèles précédents nous a conduites à étudier

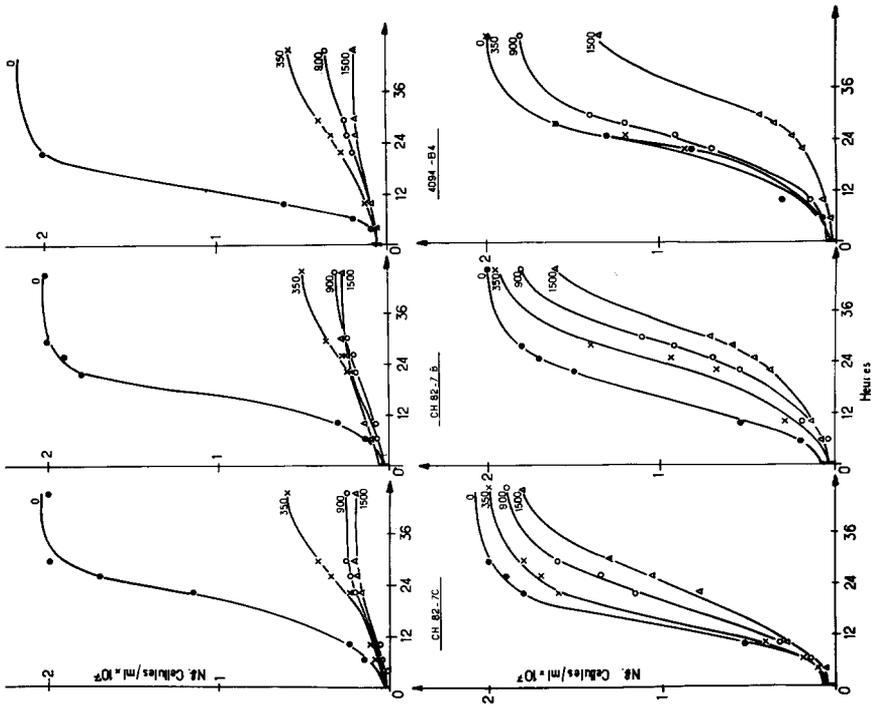


FIGURE 2.—Croissance de souches haploïdes de différents génotypes en présence de concentrations variées de DL-PPP. Les nombres portés à l'extrémité de chaque courbe représentent la concentration en µg/ml de DL-PPP. Souches de gauche à droite.—En haut: 4094-B (*AAP*; *eth*^s; *eth*₂^s); CH 82-10D (*AAP*; *eth*^s; *eth*₂^r); CH 82-7D (*AAP*; *eth*₁^r; *eth*₂^r). En bas: 4094-B4 (*aap*; *eth*₁^s; *eth*₂^r); CH 82-7B (*aap*; *eth*₁^s; *eth*₂^s); 4094-B4 (*aap*; *eth*₁^r; *eth*₂^r).

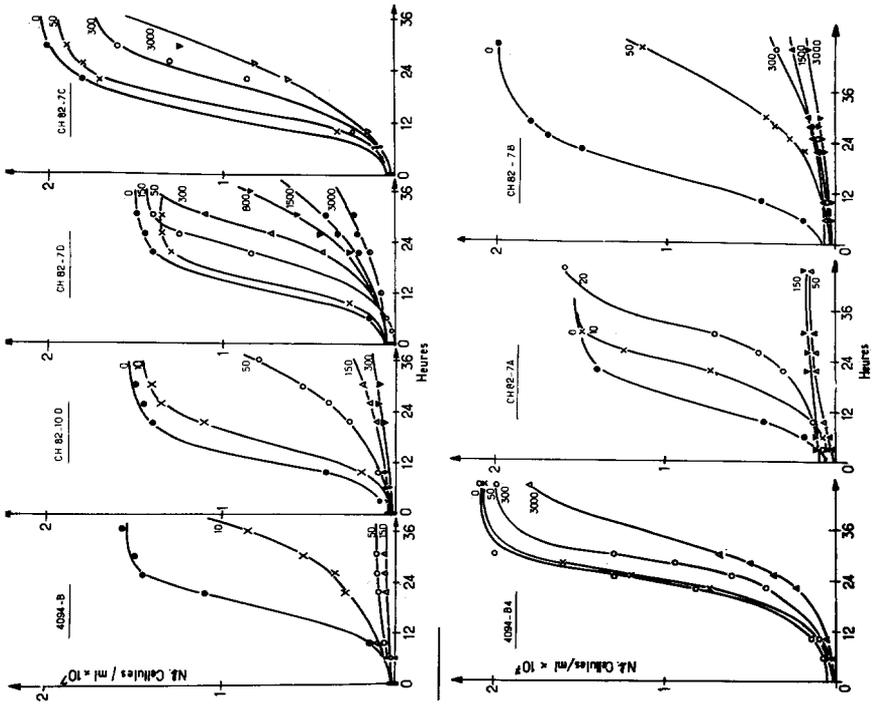


FIGURE 1.—Croissance de souches haploïdes de différents génotypes en présence de concentrations variées de DL-éthionine. Les nombres portés à l'extrémité de chaque courbe représentent la concentration en µg/ml de DL-éthionine. Souches, de gauche à droite.—En haut: 4094-B (*AAP*; *eth*₁^s; *eth*₂^s); CH 82-10D (*AAP*; *eth*^s; *eth*₂^r); CH 82-7D (*AAP*; *eth*₁^r; *eth*₂^r); CH 82-7C (*aap*; *eth*₁^s; *eth*₂^r). En bas: 4094-B4 (*aap*; *eth*₁^r; *eth*₂^r); CH 82-7A (*AAP*; *eth*₁^r; *eth*₂^s); CH 82-7B (*aap*; *eth*₁^s; *eth*₂^s).

d'une manière plus approfondie, le comportement de souches portant différentes combinaisons de ces trois caractères, à la fois du point de vue du temps moyen de génération (T.M.G.) et du point de vue du rendement final des cultures.

Nous avons limité cette étude à l'éthionine et à la parafluorophénylalanine (PFP).

A. *Souches haploïdes.* Les figures 1 et 2 représentent les courbes de croissance des souches haploïdes de différents génotypes en présence de plusieurs concentrations d'éthionine ou de PFP.

Pour permettre une comparaison plus complète et plus directe entre ces courbes de croissance nous avons porté, en fonction de la concentration en éthionine, d'une part, les temps moyens de génération (Figure 3) et, d'autre part, les rendements obtenus après 36 heures de culture (Figure 4). En effet, certaines concentrations, bien que limitant la vitesse de croissance ne modifient pas le rendement final atteint tandis que des concentrations plus fortes modifient les deux paramètres.

Souches portant l'allèle eth₂^r. (a) *Etude du couple d'allèles AAP/aap.* Nous allons comparer la souche CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*) et la souche CH 82-7C (*aap; eth₁^s; eth₂^r*). On voit qu'il existe (Figures 1, 2) une très grande différence

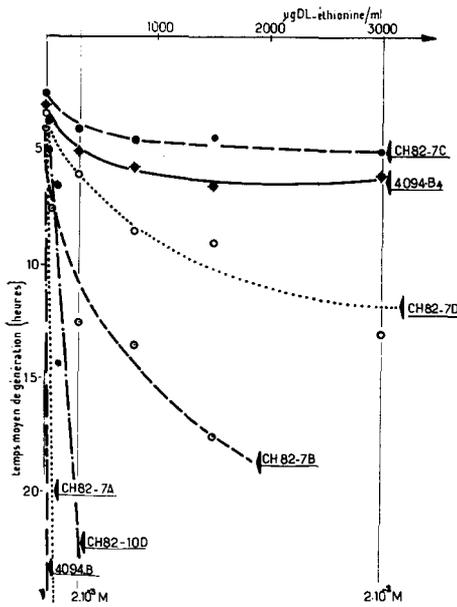


FIGURE 3.—Effet de la concentration en DL-éthionine sur le temps moyen de génération de souches haploïdes de différents génotypes. Souches: CH 82-7C (*aap; eth₁^s; eth₂^r*); 4094-B4 (*aap; eth₁^r; eth₂^r*); CH 82-7D (*AAP; eth₁^r; eth₂^r*); CH 82-7B (*aap; eth₁^s; eth₂^s*); CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*); CH 82-7A (*AAP; eth₁^r; eth₂^s*); 4094-B (*AAP; eth₁^s; eth₂^s*).

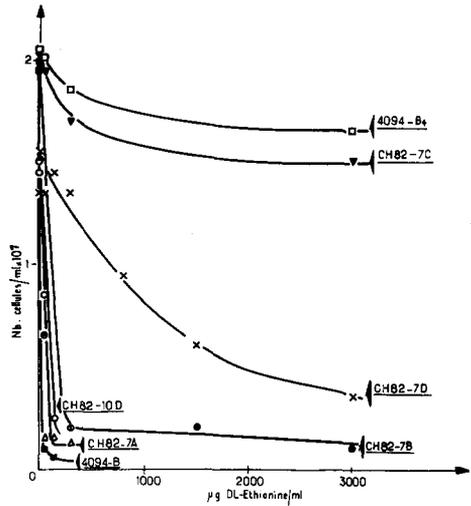


FIGURE 4.—Effet de la concentration en DL-éthionine sur le rendement de la croissance de souches haploïdes de différents génotypes. Le rendement, exprimé en cellules/ml de culture, est mesuré après 36 heures. Souches: 4094-B4 (*aap; eth₁^r; eth₂^r*); CH 82-7C (*aap; eth₁^s; eth₂^r*); CH 82-7D (*AAP; eth₁^r; eth₂^r*); CH 82-7B (*aap; eth₁^s; eth₂^s*); CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*); CH 82-7A (*AAP; eth₁^r; eth₂^s*); 4094-B (*AAP; eth₁^s; eth₂^s*).

entre ces deux souches, aussi bien en ce qui concerne la résistance à l'éthionine que la résistance à la PFP. En effet, alors que la souche CH 82-10D est déjà sensible à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'éthionine et est tout à fait inhibée par une concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$, la souche CH 82-7C est à peine inhibée par cette dernière concentration et croît encore très bien en présence de 3000 $\mu\text{g/ml}$ d'éthionine ce qui correspond à la concentration $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ utilisée pour les milieux solides (Figure 1). A cette dernière concentration, le temps moyen de génération est simplement doublé (Figure 3) et le rendement abaissé de 25% (Figure 4).

Parallèlement, en ce qui concerne la PFP (Figure 2), on voit que la concentration de 350 $\mu\text{g/ml}$ qui inhibe presque totalement la croissance de CH 82-10D n'a pratiquement pas d'effet sur la croissance de CH 82-7C, cette dernière souche présentant encore une résistance importante pour une concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$.

(b) *Etude du couple d'allèles* eth_1^r/eth_1^s . Nous allons comparer à nouveau la souche CH 82-10D ($AAP; eth_1^s; eth_2^r$) mais cette fois avec la souche CH 82-7D ($AAP; eth_1^r; eth_2^r$).

La résistance à l'éthionine conférée par l'allèle eth_1^r (Figure 1), bien que n'atteignant pas le niveau élevé dû à l'allèle aap , permet néanmoins une résistance très nette à des concentrations intermédiaires telles que 300 $\mu\text{g/ml}$ (correspondant à la concentration $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ utilisée pour les milieux solides). On voit par ailleurs (Figure 2), que la souche CH 82-7D se comporte, vis-à-vis de la PFP, de la même manière que la souche CH 82-10D qui porte l'allèle eth_1^s .

Ces résultats confirment l'existence de deux différences fondamentales entre les phénotypes conférés par les allèles aap et eth_1^r . Seul l'allèle aap confère une résistance à la PFP. Le niveau de résistance vis-à-vis de l'éthionine diffère par un facteur 10. En effet, pour la souche CH 82-7D, l'addition d'éthionine $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ (300 $\mu\text{g/ml}$) affecte le temps de génération et le rendement d'une manière parallèle à celle de la concentration $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ (3000 $\mu\text{g/ml}$) sur les souches portant l'allèle aap , ex.: CH 82-7C. Par contre, à $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$, l'allongement du temps de génération est très prononcé et on observe une chute très importante du rendement après 36 heures (Figures 3, 4). De plus, la présence simultanée des allèles aap et eth_1^r (4094-B4) ne confère pas un niveau de résistance plus élevé que celui observé chez une souche portant l'allèle aap seul.

Souches portant l'allèle eth_2^s . (a) *Etude du couple d'allèles* eth_2^s/eth_2^r . La comparaison va concerner ici, d'une part, le type sauvage 4094-B ($AAP; eth_1^s; eth_2^s$) et, d'autre part, la souche CH 82-10D ($AAP; eth_1^s; eth_2^r$). Il s'agit donc de deux souches sensibles. On voit cependant (Figure 1), que la présence de l'allèle muté eth_2^r introduit une résistance très faible mais non négligeable, vis-à-vis de l'éthionine. En effet, pour une concentration d'éthionine de 10 $\mu\text{g/ml}$, la croissance de la souche 4094-B est fortement inhibée, alors que celle de la souche CH 82-10D ne l'est pratiquement pas. De plus, pour une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, l'arrêt de croissance de la souche 4094-B est total alors que la souche CH 82-10D présente encore une légère croissance. Toutefois, l'examen des figures 3 et 4 montre que la résistance conférée par l'allèle eth_2^r est faible par rapport à celle conférée par l'allèle eth_1^r et a fortiori par l'allèle aap .

Comme l'on pouvait s'y attendre, la souche 4094-B se comporte de la même manière que la souche CH 82-10D vis-à-vis de la PFP (figure 2).

(b) *Effet de l'allèle eth₂^s sur le phénotype des souches portant l'allèle aap.* La comparaison entre les souches CH 82-7C (*aap; eth₁^s; eth₂^r*) et CH 82-7B (*aap; eth₁^s; eth₂^s*) montre que la présence de l'allèle *eth₂^s* ramène la résistance envers l'éthionine à un niveau très bas (figure 1), la souche CH 82-7B redevenant en effet, sensible à la concentration de 2·10⁻³M. Cette chute du niveau de résistance se manifeste à la fois par un allongement du temps moyen de génération (figure 3) et par un abaissement considérable du rendement (figure 4). D'autre part, l'examen de la figure 2 permet de constater que la présence de l'allèle *eth₂^s* ne modifie pas la résistance envers la PFP due à l'allèle *aap*.

(c) *Effet de l'allèle eth₂^s sur le phénotype des souches portant l'allèle eth₁^r.* On voit sur la figure 1 (souches CH 82-7D: *AAP; eth₁^r; eth₂^r* et CH 82-7A: *AAP; eth₁^r; eth₂^s*) que la présence de l'allèle *eth₂^s* chez une souche portant l'allèle *eth₁^r* telle que CH 82-7A, confère à celle-ci une sensibilité extrême envers l'éthionine. Cette sensibilité est comparable à celle de la souche sauvage 4094-B,

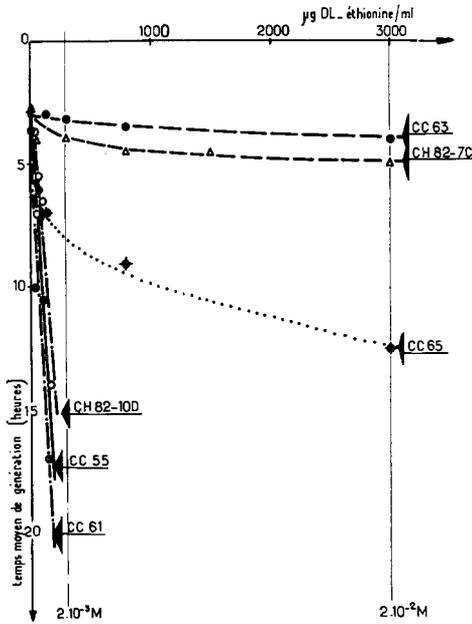


FIGURE 5.—Effet de la concentration en DL-éthionine sur le temps moyen de génération de souches haploïdes et diploïdes de différents génotypes. Souches haploïdes: CH 82-7C (*aap; eth₁^s; eth₂^r*); CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*). Souches diploïdes: CC 63 (*aap/aap; eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*); CC 65 (*aap/aap; eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*); CC 55 (*AAP/aap; eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*); CC 61 (*AAP/AAP; eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*).

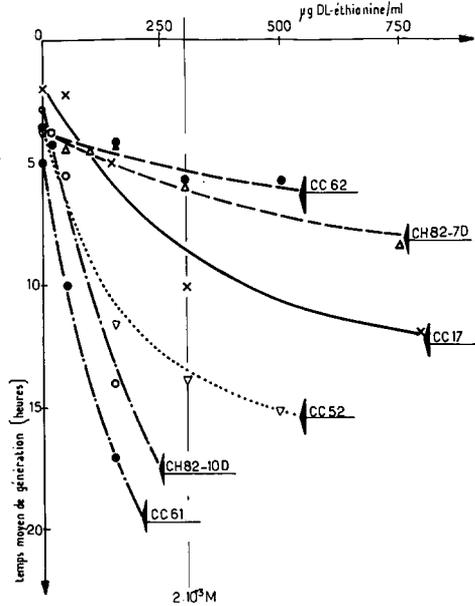


FIGURE 6.—Effet de la concentration en DL-éthionine sur le temps moyen de génération de souches haploïdes et diploïdes de différents génotypes. Souches haploïdes: CH 82-7D (*AAP; eth₁^r; eth₂^r*); CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*). Souches diploïdes: CC 62 (*AAP/AAP; eth₁^r/eth₁^r; eth₂^r/eth₂^r*); CC 17 (*AAP/AAP; eth₁^r/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*); CC 52 (*AAP/AAP; eth₁^r/eth₁^r; eth₂^s/eth₂^r*); CC 61 (*AAP/AAP; eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r*).

comme le montrent les figures 3 et 4. Il existe donc une différence importante entre l'effet de l'allèle eth_2^s sur les allèles eth_1^r et aap , puisque la résistance conférée par l'allèle eth_1^r se trouve totalement annulée, tandis que celle conférée par l'allèle aap est seulement ramenée à un niveau plus bas.

B. *Souches diploïdes*. L'ensemble des résultats concernant l'étude de la croissance des diploïdes homozygotes et hétérozygotes est résumé dans les figures 5 et 6 ainsi que dans les tableaux 1 et 2.

Comparaison avec les souches haploïdes (Figures 5, 6). Dans tous les cas, les diploïdes homozygotes, ont des temps de génération, en présence de DL-éthionine, voisins de ceux observés pour les souches haploïdes correspondantes: CC 63 et CH 82-7D; CC 61 et CH 82-10D; CC 62 et CH 82-7C.

Dominance—récessivité. Nous avons indiqué au cours du précédent article, quels étaient les allèles dominants pour chacun des trois gènes que nous avons mis en évidence. Cependant, l'étude qui avait été faite, était simplement basée sur l'apparition de colonies sur milieux solides. Il nous a donc paru nécessaire d'étudier d'une manière plus précise la dominance des allèles AAP , eth_1^r et eth_2^s .

AAP/aap . On voit, dans la figure 5 ainsi que dans le tableau 1, que l'allèle AAP exerce une dominance absolue sur l'allèle aap , aussi bien en ce qui concerne le temps de génération que le rendement, et ceci même après 54 heures (voir diploïdes CC 61: AAP/AAP ; CC 55: AAP/aap ; et CC 65: aap/aap).

eth_1^r/eth_1^s (figure 6; tableau 1). La comparaison des diploïdes CC 62 (eth_1^r/eth_1^r), CC 17 (eth_1^r/eth_1^s) et CC 61 (eth_1^s/eth_1^s), montre que, contrairement au cas précédent, la dominance de l'allèle eth_1^r n'est que partielle. En effet, aussi bien le temps moyen de génération que le rendement sont beaucoup plus affectés par la présence d'éthionine chez l'hétérozygote eth_1^r/eth_1^s que chez l'homozygote eth_1^r/eth_1^r . Toutefois, si l'on compare l'hétérozygote avec l'homozygote eth_1^s/eth_1^s , il apparaît de manière indiscutable, que la présence de l'allèle eth_1^r confère une résistance nette vis-à-vis de l'éthionine. L'hétérozygote est finalement capable d'atteindre un rendement comparable à celui de l'homozygote eth_1^r/eth_1^r , tandis que la croissance de l'homozygote eth_1^s/eth_1^s se trouve arrêtée à un niveau très bas en présence d'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$.

eth_2^s/eth_2^r (figures 5, 6; tableau 2). L'étude des souches haploïdes nous a permis de constater que l'allèle eth_2^r confère une résistance très faible vis-à-vis de l'éthionine. Néanmoins, les phénotypes conférés par les allèles eth_2^s et eth_2^r , en absence de tout caractère de résistance, sont trop voisins pour que l'on puisse les différencier aisément; il était donc nécessaire de tester l'effet de l'allèle eth_2^s , en présence de l'un ou de l'autre des caractères de résistance.

Le fait que l'allèle AAP soit dominant, implique l'utilisation d'une souche homozygote aap/aap pour révéler l'action de l'allèle eth_2^s . Quant à l'allèle eth_1^r nous venons de voir qu'à l'état hétérozygote, il se comporte comme un allèle partiellement dominant. Il nous a donc paru préférable d'utiliser également, dans ce cas, une souche homozygote eth_1^r/eth_1^r pour étudier l'effet de l'allèle eth_2^s .

L'examen des figures 5 et 6 permet de constater que les diploïdes homozygotes eth_2^r/eth_2^r se comportent d'une manière analogue à celle de l'haploïde correspondant (CC 62 et CH 82-7D; CC 63 et CH 82-7C; CC 61 et CH 82-10D).

TABLEAU 1
Recherche de la dominance pour les couples d'allèles AAP/aap et eth₁^r/eth₁^s, chez des diploïdes homozygotes eth₂^r/eth₂^r

		Genotypes des souches											
		<i>eth₁^s/eth₁^s; eth₂^r/eth₂^r</i>					<i>eth₁^r/eth₁^r; eth₂^r/eth₂^r</i>						
		AAP/AAP (1)		AAP/aap (2)		aap/aap (3)		AAP/AAP (1)		AAP/aap (2)		aap/aap (3)	
		G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éth. 2·10 ⁻³ M
Milieux:		G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21
T.M.G.		5	23	∞	∞	2	25	∞	∞	3	3,2	4	4
Rendement (a)		2,2×10 ⁷	2,0×10 ⁶	0	0	2,3×10 ⁷	3,0×10 ⁶	0	0	2,3×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,9×10 ⁷	1,9×10 ⁷
Rendement (b)		2,2×10 ⁷	3,0×10 ⁶			2,3×10 ⁷	3,8×10 ⁶			2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷
<i>AAP/AAP; eth₂^r/eth₂^r</i>													
<i>eth₁^r/eth₁^r (+)</i>													
		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M	
Milieux:		G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21	G21
T.M.G.		3,5	5,5	2	8,5	5	23	5	23	5	23	5	23
Rendement (a)		2,3×10 ⁷	1,8×10 ⁷	2,1×10 ⁷	5,0×10 ⁶	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷	2,2×10 ⁷
Rendement (b)		2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,5×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,5×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,5×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,5×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,5×10 ⁷

T.M.G.: temps moyen de génération en heures.
 Rendement: exprimé en cellules/ml de culture. a—après 36 heures; b—après 54 heures.
 Souches diploïdes: (1) = CC 61; (2) = CC 55; (3) = CC 63; (4) = CC 62; (5) = CC 17.

TABLEAU 2

Recherche de la dominance pour le couple d'allèles eth_2^s/eth_2^r chez des diploïdes possédant l'un des deux caractères de résistance à l'état homozygote

Mileux:	Genotypes des souches					
	<i>aap/aap; eth_1^s/eth_1^s</i>					
	<i>eth_2^r/eth_2^r</i> (1)			<i>eth_2^s/eth_2^r</i> (2)		
	G21	G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻² M		G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M	G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻² M
T.M.G.	3	3,2	4	2,5	8	12,5
Rendement (a)	2,3×10 ⁷	2,1×10 ⁷	1,9×10 ⁷	2,2×10 ⁷	9,0×10 ⁶	3,0×10 ⁶
Rendement (b)	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,2×10 ⁷	1,8×10 ⁷	5,5×10 ⁶

Mileux:	<i>AAP/AAP; eth_1^r/eth_1^r</i>			
	<i>eth_2^r/eth_2^r</i> (3)		<i>eth_2^s/eth_2^r</i> (4)	
	G21	G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M	G21	G21 + DL-éthionine 2·10 ⁻³ M
T.M.G.	3,5	5,5	3,5	13,5
Rendement (a)	2,3×10 ⁷	1,8×10 ⁷	2,3×10 ⁷	3,0×10 ⁶
Rendement (b)	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	2,3×10 ⁷	4,5×10 ⁶

T.M.G.: temps moyen de génération en heures.

Rendement: exprimé en cellules/ml de culture. a—après 36 heures; b—après 54 heures.

Souches diploïdes: (1)=CC 63; (2)=CC 65; (3)=CC 62; (4)=CC 52.

L'effet de l'allèle eth_2^s présent à l'état hétérozygote chez une souche homozygote eth_1^r/eth_1^r (CC 52) ramène la résistance de cette souche vis-à-vis de l'éthionine, à la fois en ce qui concerne le temps moyen de génération et le rendement (Figure 6; Tableau 1 et 2), à un niveau inférieur à celui du diploïde hétérozygote eth_1^r/eth_1^s , ne possédant pas l'allèle eth_2^s (CC 17).

Si l'on compare maintenant le niveau de résistance d'une souche homozygote *aap/aap*, et hétérozygote eth_2^s/eth_2^r (CC 65) à celui d'une souche homozygote *aap* mais dépourvue de l'allèle eth_2^s (CC 63), on voit que la présence de l'allèle eth_2^s amène, outre un allongement prononcé du temps de génération, une diminution du niveau de résistance qui passe de 2·10⁻²M (souche CC 63) à 2·10⁻³M (souche CC 65). La résistance à cette dernière concentration n'intervient d'ailleurs qu'après un temps très long (Figure 5; Tableau 2).

Il paraît donc évident que l'allèle eth_2^s est dominant sur l'allèle eth_2^r . L'étude des diploïdes apporte, de plus, des renseignements concernant l'effet d'un seul allèle eth_2^s mis en présence de deux allèles *aap* ou de deux allèles eth_1^r .

II. Etude de la levée de l'inhibition causée par l'éthionine

Pour entreprendre cette étude, nous avons sélectionné pour chaque souche considérée, une concentration d'éthionine causant une inhibition très marquée mais en évitant toutefois d'introduire un gros excès d'inhibiteur. Nous avons tout d'abord étudié l'action de différents acides aminés sur l'inhibition causée par l'éthionine, ceci chez la souche sauvage 4094-B et chez la souche CH 82-10D (*AAP; eth_1^s; eth_2^r*), dans le but de vérifier la spécificité de la méthionine. Pour cette étude, nous avons utilisé des concentrations d'acides aminés; soit égales, soit

TABLEAU 3

Etude de l'action de différents acides aminés sur l'inhibition de la croissance causée par l'éthionine chez deux souches haploïdes sensibles

Souche 4094-B: <i>AAP; eth₁^s; eth₂^s</i>		Souche CH 82-10D: <i>AAP; eth₁^s; eth₂^r</i>	
Additions au milieu de base G21 ($\mu\text{g/ml}$)	Rendement (%)	Additions au milieu de base G21 ($\mu\text{g/ml}$)	Rendement (%)
.....	100	100
DL-éthionine 50	3	DL-éthionine 200	4
" + DL-méthionine 5	23	" + DL-méthionine 20	67
" + DL-méthionine 50	90	" + DL-méthionine 200	100
" + DL-thréonine 50	2	" + DL-thréonine 200	13
" + DL-thréonine 250	2	" + DL-thréonine 1000	19
" + L-cystéine 25	6	" + L-cystéine 100	23
" + L-cystéine 125	6	" + L-cystéine 500	13
" + L-lysine 25	2	" + L-lysine 100	6
" + L-lysine 125	3	" + L-lysine 500	8
" + L-glutamate 25	3	" + L-glutamate 100	7
" + L-glutamate 125	2	" + L-glutamate 500	8

Les rendements ont été exprimés par rapport à celui obtenu dans chaque cas sur milieu G21, après 28 heures de culture.

dix fois supérieures à celles de l'éthionine. Aux concentrations d'éthionine utilisées, la compétition au niveau de l'acide-amino perméase, ne modifie pas son accumulation de manière importante (SURDIN *et al.* 1965).

Les résultats obtenus, qui sont consignés dans le tableau 3, montrent que, seule la méthionine est capable de lever l'inhibition due à l'éthionine chez la souche sauvage 4094-B. Il en est d'ailleurs de même chez la souche CH 82-10D (*AAP; eth₁^s; eth₂^r*) bien que l'on puisse noter un léger effet de la thréonine et de la cystéine, effet qui ne semble pas, toutefois, être influencé par la concentration de ces deux acides aminés.

Ensuite, nous avons recherché l'effet de la méthionine sur des souches choisies pour représenter différentes combinaisons géniques en utilisant cette fois des concentrations dix fois inférieures, égales et dix fois supérieures à celles de l'éthionine. Nous avons d'autre part, étudié l'effet de l'adénine sur l'inhibition causée par l'éthionine.

L'examen du tableau 4 montre que, quelle que soit la souche, la méthionine, à une concentration équimolaire de celle de l'éthionine, rétablit une croissance normale, aussi bien en ce qui concerne le temps de génération que le rendement. Quant à l'adénine, elle n'a aucun effet de réversion sur l'inhibition due à l'éthionine et son addition à de faibles concentrations de méthionine ne semble pas modifier l'action de cette dernière.

RÉSUMÉ ET DISCUSSION

Les résultats concernant chaque point important de ce travail ont été commentés au fur et à mesure de leur présentation. L'ensemble de ces résultats confirme et complète les conclusions qui avaient déjà été tirées de la partie

TABLEAU 4

Etude de l'action de la méthionine et de l'adénine sur l'inhibition de la croissance causée par l'éthionine chez des souches haploïdes de différents génotypes

Additions au milieu de base G21 ($\mu\text{g/ml}$)	Temps moyens de génération (heures)	Rendement (%)	Additions au milieu de base G21 ($\mu\text{g/ml}$)	Temps moyens de génération (heures)	Rendement (%)
Souche 4094-B: <i>AAP; eth₁^s; eth₂^s</i>			Souche CH 82-10D: <i>AAP; eth₁^s; eth₂^r</i>		
.....	4,25	100	4,00	100
DL-éthionine 50	∞	8	DL-éthionine 200	11,00	13
" + DL-méth. 5	4,00	50	" + DL-méth. 20	4,50	72
" + DL-méth. 50	4,25	110	" + DL-méth. 200	4,00	94
" + DL-méth. 500	5,50	95	" + DL-méth. 2000	4,00	94
" + adénine 150	∞	8	" + adénine 150	>17	13
" + adénine 150			" + adénine 150		
+ DL-méth. 2,5	8,50	39	+ DL-méth. 10	6,00	72
Souche CH 82-7A: <i>AAP; eth₁^r; eth₂^s</i>			Souche CH 82-7D: <i>AAP; eth₁^r; eth₂^r</i>		
.....	3,00	100	5,00	100
DL-éthionine 50	∞	8	DL-éthionine 1500	14,00	14
" + DL-méth. 5	4,00	63	" + DL-méth. 150	6,50	62
" + DL-méth. 50	5,25	68	" + DL-méth. 1500	6,00	62
" + DL-méth. 500	4,50	79	" + DL-méth. 2500	7,50	38
" + adénine 150	∞	8	" + adénine 150	>14	14
" + adénine 150			" + adénine 150		
+ DL-méth. 2,5	9,50	50	+ DL-méth. 75	6,00	62
Souche CH 82-7B: <i>aap; eth₁^s; eth₂^s</i>			Souche CH 82-7C: <i>aap; eth₁^s; eth₂^r</i>		
.....	2,50	100	4,50	100
DL-éthionine 3000	5,50	3	DL-éthionine 3000	5,00	67
" + DL-méth. 300	2,00	113	" + DL-méth. 300	4,00	106
" + DL-méth. 3000	3,50	100	" + DL-méth. 3000	3,00	118
" + DL-méth. 30000	3,50	87	" + DL-méth. 30000	3,00	118

Les rendements ont été exprimés par rapport à celui obtenu dans chaque cas sur milieu G21, après 24 heures de culture.

généti- que de ce travail (CHEREST et DE ROBICHON-SZULMAJSTER 1966). Notamment, les concentrations de routine que nous avons utilisées pour l'étude génétique afin de différencier les phénotypes *eth₁^r* et *aap* ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ respectivement) se sont révélées être des concentrations permettant de discriminer efficacement les différents phénotypes de résistance. De plus, le phénotype de résistance à l'éthionine conféré, indépendamment, par les allèles *eth₁^r* et *aap*, peut être supprimé dans le premier cas et abaissé très considérablement dans le second cas, par la présence de l'allèle *eth₂^s*. Cet allèle ne modifie pas le phénotype de résistance à la parafluorophénylalanine (PFP) dû à l'allèle *aap*.—Par ailleurs, l'étude physiologique que nous venons de présenter a permis d'établir, d'une manière aussi précise que possible, l'étendue de la dominance, pour chacun des couples d'allèles considérés. Nous avons montré que la dominance de l'allèle *AAP* sur l'allèle *aap* est absolue tandis que celle de l'allèle *eth₁^r* sur l'allèle *eth₁^s* est seulement partielle. Dans le cas du couple d'allèle *eth₂^s/eth₂^r*, il paraît certain que l'allèle *eth₂^s* est dominant et qu'il agit bien comme un suppresseur phénotypique ou un gène modificateur spécifique de l'éthionine.—La comparaison de l'action

de l'allèle eth_2^s sur la résistance à l'éthionine présentée par des diploïdes homozygotes et hétérozygotes pour l'un ou l'autre des gènes de résistance, nous a amenées à conclure qu'un dose d' eth_2^s est capable d'antagoniser plus d'une dose de l'allèle eth_1^r ou de l'allèle aap .—D'autre part, nous avons vu que seule la méthionine, à des concentrations équimolaires de celles de l'éthionine, est capable de lever l'inhibition due à l'éthionine, et ceci chez des souches de différents génotypes. Nous avons confirmé en ceci les résultats de MAW (1961), en particulier en ce qui concerne l'absence d'effet de l'adénine.

Indépendamment des questions de perméabilité cellulaire, la résistance à l'éthionine pourrait être conférée par des mutations de plusieurs types. (1) Acquisition ou augmentation de la capacité de destruction de l'éthionine: détoxification. Une mutation de ce type a été mise en évidence chez *E. coli* (MARTIN et MOO-PENN 1963). (2) Mutation dans la capacité d'activation en S-adosyl-éthionine, conduisant à une impossibilité de transférer le groupement éthyle de l'éthionine à la place du groupement méthyle de la méthionine. Une mutation de ce type semble exister chez *Coprinus lagopus* (LEWIS 1963). (3) Mutation dans les mécanismes d'activation ou de transfert impliqués dans la synthèse des protéines, conduisant à l'incapacité d'incorporer dans celles-ci l'éthionine à la place de la méthionine. Une mutation de ce type a été décrite chez *E. coli* en ce qui concerne la PFP (FANGMAN et NEIDHARDT 1964): modification de la spécificité de la phénylalanine-S RNA synthétase. On peut s'attendre à ce qu'une mutation dans les mécanismes 2 ou 3 ne confère qu'une résistance partielle (ou nulle) envers l'éthionine, puisque l'autre mécanisme conduisant à la toxicité de l'éthionine subsiste. (4) Par contre, une mutation provoquant une surproduction de méthionine (modification des mécanismes de régulation de la biosynthèse de la méthionine) peut conduire à une résistance envers cet analogue en créant une compétition efficace au niveau des deux systèmes précédents; de telles mutations ont été décrites chez *E. coli* (ADELBERG 1958; COHEN et JACOB 1959) et chez *Neurospora* (METZENBERG *et al.* 1964).—L'étude biochimique des mutants que nous venons de décrire est en cours. Des résultats préliminaires permettent de penser que la mutation $eth_2^s \rightarrow eth_2^r$ pourrait correspondre soit à une mutation de type 2, soit à une mutation de type 4, tandis que la mutation $eth_1^s \rightarrow eth_1^r$ serait une mutation de type 4; le fait que cette dernière mutation soit semi-dominante montre qu'il pourrait s'agir soit d'une mutation de type opérateur soit d'une mutation de désensibilisation concernant un enzyme normalement inhibé par l'éthionine.—L'incapacité de l'adénine à lever l'inhibition causée par l'éthionine tendrait à prouver que si l'activation en S-adosyl-éthionine est, comme nous le supposons, une des causes de sensibilité d'une souche sauvage de *S. cerevisiae* envers l'éthionine, son mécanisme est peut-être plus complexe que l'établissement d'une carence en ATP due à l'accumulation de S-adosyl-éthionine telle qu'elle a été mise en évidence chez les mammifères (FARBER *et al.* 1964).

SUMMARY

Growth has been studied in an effort to characterize, as precisely as possible, phenotypic expression for each of the alleles AAP/aap , eth_1^r/eth_1^s , and $eth_2^s/$

eth₂^r, and for their different combinations in haploid and diploid strains. We have generally considered both mean generation time (TMG) and yield. Strains carrying *aap* (in the presence of *eth₂^r*) are insensitive to ethionine: at a concentration of 3000 $\mu\text{g/ml}$, generation time is simply doubled and yield diminished by only 25%. Strains carrying *aap* but in the presence of *eth₂^s* are returned to a resistance level lower than 10^{-3}M . Strains carrying *eth₁^r* in the presence of *eth₂^r* are resistant to ethionine $2 \times 10^{-3}\text{M}$. This resistance is completely suppressed by *eth₂^s*. In the absence of a gene for resistance, there is a slight difference between strains carrying the alleles *eth₂^s* and *eth₂^r*, the former being sensitive to as little as 10 $\mu\text{g/ml}$ ethionine, the latter to only 50 $\mu\text{g/ml}$. This difference is small compared to the effect of the other resistant alleles. Parafluorophenylalanine resistance due to *aap* is not affected by *eth₂^s*, which appears to exert its suppressive effect only on ethionine resistance, regardless of the genetic basis of this resistance (*aap* or *eth₁^r*). Dominance of *AAP* over *aap* is complete whichever phenotype is considered, ethionine or parafluorophenylalanine resistance. Dominance of *eth₁^r* over *eth₁^s* is intermediate. The semidominant behaviour of the allele *eth₁^r* is consistent with either an operator mutation or a mutation by loss of a feed-back control, normally exerted by ethionine. Dominance of *eth₂^s* over *eth₂^r* seems to be complete. In addition, the action of one allele *eth₂^s* is estimated to be greater than suppression of one *eth₁^r* allele or one *aap* allele, though not sufficient to suppress completely two of these alleles. Reversal experiments have been carried out with a certain number of amino acids and with adenine. Only methionine has been found to be active in reversing ethionine inhibition. For each genotype, the reversal antagonism is already effective for equimolar concentrations of ethionine and methionine.—Biochemical bases of ethionine toxicity have been discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- ADELBERG, E. A., 1958 Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. *J. Bacteriol.* **76**: 326.
- CHEREST, H., et H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, 1966 Résistance à l'éthionine chez *Saccharomyces cerevisiae*. I. Etude génétique. *Genetics* **54**: 981-991.
- COHEN, G. N., et F. JACOB, 1959 Sur la répression de la synthèse des enzymes intervenant dans la formation du tryptophane chez *E. coli*. *Compt. Rend.* **248**: 3490-3492.
- FANGMAN, W. L., et F. C. NEIDHARDT, 1964a Demonstration of an altered aminoacyl ribonucleic acid synthetase in a mutant of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **239**: 1839-1843. — 1964b Protein and ribonucleic acid synthesis in a mutant of *Escherichia coli* with an altered aminoacyl ribonucleic acid synthetase. *J. Biol. Chem.* **239**: 1844-1847.
- FARBER, E., K. H. SHULL, S. VILLA-TREVINO, B. LOMBARDI et M. THOMAS, 1964 Biochemical pathology of acute hepatic adenosine triphosphate deficiency. *Nature* **203**: 34-40.
- LEWIS, D., 1963 Structural gene for the methionine-activating enzyme and its mutation as a cause of resistance to ethionine. *Nature* **200**: 151-154.
- LOVELESS, L. E., E. SPOERL, et T. H. WEISMAN, 1954 A survey of effects of chemicals on division and growth of yeast and *E. coli*. *J. Bacteriol.* **68**: 637-644.
- MARTIN, W. R., et W. F. MOO-PEN, 1963 Studies on the mechanism of *Escherichia coli* resistance to ethionine. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **114**: 665-668.

- MAW, G. A., 1961 Ability of S-methyl-L-cysteine to annul the inhibition of yeast growth by L-ethionine and by S-ethyl-L-cysteine. *J. Gen. Microbiol.* **25**: 441-449.
- METZENBERG, R. L., M. S. KAPPY, et J. W. PARSON, 1964 Irreparable mutations and ethionine resistance in *Neurospora*. *Science* **145**: 1434-1435.
- SURDIN, Y., W. SLY, J. SIRE, A. M. BORDES, et H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, 1965 Système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*: propriétés et contrôle génétique. *Biochim. Biophys. Acta* **107**: 546-566.
- VILLA-TREVINO, S., et E. FARBER, 1962 The reversal by adenosine-triphosphate of ethionine induced inhibition of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **61**: 649-651.
- VILLA-TREVINO, S., K. H. SHULL, et E. FARBER, 1963 The role of adenosine-triphosphate deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **238**: 1757-1763.